Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 19, No. 1, Mar- Apr 2023, p. 95-106

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۹، شماره ۱، فروردین- اردیبهشت ۱۴۰۲ ص.۱۰۶-۹۵

Homepage: http://ifstrj.um.ac.ir
Research Paper

The Effect of Chitosan Edible Coating on Physicochemical Properties and Enzymatic Activity of Grape Fruit Cultivar Fakhri in Cold Storage Conditions

M. Shokri[1]- M. Rahmati-Joneidabad[2]*- M. Heidari[3]- M. Rasouli[4]- A. Zare[5]

Received: 2022.02.21
Revised: 2022.04.06
Accepted: 2022.04.11
Available Online: 2022.04.11

How to cite this article:
Shokri, M., Rahmati-Joneidabad, M., Heidari, M., Rasouli, M., & Zare, A. (2023). The effect of chitosan edible coating on physicochemical properties and enzymatic activity of grape fruit cultivar Fakhri in cold storage conditions. *Iranian Food Science and Technology Research Journal 19*(1): 95-106. (In Persian with English abstract). http://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.75449.1150

Introduction

Chitosan, as a bio-polymer, has many applications in agriculture. Coating fruits and vegetables with chitosan plays a positive role in increasing their shelf-life, since the chitosan coating reduce growth of fungi and preserves the quality of the fruits longer.

Materials and Methods

This study was conducted to evaluate the effect of chitosan treatments (0, 0.25, 0.5 and 1%) and storage time (0, 20, 40 and 60 days) on maintaining quantitative and qualitative parameters and shelf life of grape fruit of Fakhri cultivar. The experiments were factorial based on a completely randomized design with three replications. The fruits were stored for 2 months. Some characteristics of fruits including percentage of weight loss, percentage of berries abscission, percentage of decay of berries, browning of berries and biochemical characteristics including titratable acidity, ascorbic acid content, total phenol, enzymes activity including peroxidase (POD), phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and polyphenol oxidase (PPO) were measured in order to investigate the best treatment.

Results and Discussion

The results showed that the traits under study were affected by different concentrations of chitosan, with the lowest percentage of weight loss associated with the concentration of 0.5% chitosan. Chitosan, by forming a semi-permeable membrane, regulates gases,and reduces the transfer of water from fruit tissues. The lowest amount of browning of berries was observed in the concentration of 0.5% chitosan. Chitosan is partly prevented from increasing the activity of brown-peroxidase in chitosan-treated fruits. There was no significant difference in concentration of 0.5% chitosan with 1% concentration. The lowest percentage of contamination and percentage of berries abscission was observed in 1% chitosan concentration. It seems that these treatments prevent the effects of ethylene levels and the formation of a swab layer at the site of fruit attachment to the cluster. The slightest increase in the titratable acidity and the lowest decrease of ascorbic acid was observed in the concentration of 1% chitosan. Higher levels of ascorbic acid in fruits that are coated with chitosan may be due to decreased oxygen levels and respiration inhibition. The highest total phenol was related to the control treatment, which may be due to the loss of chlorophyll and the onset of synthesis of phenolic compounds. The highest level of activity of PAL enzyme was observed in the concentration of 0.5% chitosan and the control. This enzyme is stimulated by various live and non-living stresses. In general, the highest activity of peroxidase

1, 2 and 3- Graduated Student of Master of Science, Assistant Professor and Associate Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: Rahmati@asnrukh.ac.ir)
4- Associate Professor of Horticultural Sciences Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran
5- Assistant Professor, Department of Plant Production and Genetics, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2022.75449.1150

enzyme was observed in the concentration of 0.5% chitosan and the highest activity of polyphenol oxidase in 1% concentration of chitosan.

Conclusion

It seems that the concentration of 1% chitosan can improve the quality of fruits for a longer time while increasing the shelf life of fruit.

Keywords: Contamination percentage, Peroxidase enzyme, Polyphenol oxidase enzyme, phenylalanine ammonia-lyase (PAL), Storage life

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 19, No. 1, Mar- Apr 2023, p. 95-106

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۹، شماره ۱، فروردین- اردیبهشت ۱۴۰۲ ص. ۱۰۶-۹۵

مقاله پژوهشی

تاثیر پوشش خوراکی کیتوزان بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و فعالیت آنزیمی میوه انگور رقم فخری در شرایط سردخانه

معصومه شکری[۱]- مصطفی رحمتی جنیدآباد[۲*]- مختار حیدری[۳]- موسی رسولی[٤]- احمد زارع[۵]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۰۲
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۱/۱۷
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۲۲

چکیده

استفاده از پوشش‌های خوراکی طبیعی برای افزایش عمر پس از برداشت محصولاتی همانند میوه‌ها، امروزه بسیار متداول شده است. کیتوزان با قابلیت کنترل میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و کاهش سرعت تبخیر و تعرق آب از بافت گیاه، به عنوان یک ماده غیرسمی طبیعی و یک پوشش خوراکی طبیعی شناخته شده است. این پژوهش، با هدف بررسی اثر تیمار کیتوزان (صفر، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ درصد) و زمان انبارمانی (صفر، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ روز) بر حفظ کیفیت و عمر انبارمانی میوه انگور رقم فخری، به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. شاخص‌های مورد ارزیابی شامل درصد کاهش وزن، درصد آلودگی، درصد ریزش حبه، میزان قهوه‌ای شدن حبه، اسیدآسکوربیک، اسیدیته قابل تیتراسیون، فنل کل، میزان فعالیت آنزیم‌های فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز، پلی‌فنل‌اکسیداز و پراکسیداز بود. نتایج نشان داد که غلظت ۱ درصد کیتوزان به‌خوبی توانست آلودگی، ریزش حبه، کاهش اسیدیته قابل تیتراسیون و کاهش اسیدآسکوربیک را کنترل نماید و بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در غلظت ۱ درصد کیتوزان مشاهده گردید و غلظت ۰/۵ درصد کیتوزان نیز سبب جلوگیری از کاهش وزن و قهوه‌ای شدن حبه‌ها نسبت به سایر غلظت‌ها و نمونه شاهد گردید و بیش‌ترین میزان فنل کل و بالاترین میزان فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز و پراکسیداز نیز مربوط به غلظت ۰/۵ درصد کیتوزان بود، این در حالی است که بین دو غلظت ۰/۵ و ۱ درصد کیتوزان در بیش‌تر صفات تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد مشاهده نشد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم پراکسیداز؛ آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز؛ آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز؛ پوشش خوراکی؛ عمر انبارمانی

مقدمه

میوه‌ها و سبزی‌های تازه به‌علت طعم و رنگ خوب و هم‌چنین ترکیبات مغذی آن‌ها مانند ویتامین‌ها، مواد معدنی و اسیدهای آمینه برای مصرف‌کنندگان بسیار جذاب هستند. یکی از مشکلات مهم نگهداری میوه‌ها و سبزی‌ها، آلودگی به انواع بیماری‌های قارچی و عمر کوتاه این محصولات پس از برداشت بوده که این مسئله به‌دلیل وجود درصد بالای آب در محصولات تازه باغبانی است (Xing *et al*., 2016).

انگور (*Vitis vinifera* L.) یک میوه با عمر پس از برداشت کوتاه و نافرازگرا[۲] است. انگور رقم فخری از انواع دانه‌دار و میان‌رس بوده و با صفاتی مانند حبه‌های درشت و بیضی شکل به رنگ سبز مایل به زرد شناخته می‌شود. این رقم با پوست حبه ضخیم، گوشت سفت و خوشه‌های متوسط تا درشت، دارای ارزش تازه‌خوری است

۱، ۲ و ۳- به‌ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد، استادیار و دانشیار، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: Rahmati@asnrukh.ac.ir)
۴- دانشیار، گروه مهندسی علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران
۵- استادیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

DOI: 10.22067/IFSTRJ.2022.75449.1150

2- Non-climacteric

(Nejatian and Doulati Baneh, 2016). عمر انبارمانی میوه انگور با کاهش سفتی، قهوه‌ای شدن و خشک شدن چوب خوشه و پوسیدگی‌های قارچی کاهش می‌یابد. رایج‌ترین روش برای کنترل پوسیدگی قارچی میوه انگور در طی دوره انبارمانی استفاده از گاز دی‌اکسیدگوگرد است. علی‌رغم اثر فوق العاده این ماده در کنترل پوسیدگی و جلوگیری از رشد قارچ، در بسیاری از کشورها استفاده از آن محدود شده است. بقایای این ترکیب برای سلامت انسان خطرناک بوده و علاوه‌بر این باعث ایجاد صدمه به میوه‌ها و سبزی‌های تازه (از جمله سفید شدن حبه‌ها و قهوه‌ای شدن دم خوشه‌ها) می‌شود (Meng *et al*., 2008). امروزه با توجه به مضرات استفاده از سموم و مواد شیمیایی برای انسان و محیط زیست، رویکردهای جدید در استفاده از موادی که اثرات سوء و زیان‌آور به همراه نداشته باشند، مورد توجه قرار گرفته است. پوشش‌های خوراکی[1] یکی از روش‌های حفظ کیفیت و افزایش مدت ماندگاری میوه‌ها و سبزی‌های تازه است (Dutta *et al*., 2009). کیتوزان، ماده غیرسمی، زیست تجزیه‌پذیر و زیست سازگار است (Ardakani *et al*., 2009). این ماده به‌عنوان یک ماده پوشش‌دهنده خوراکی، اتمسفر درونی میوه را تغییر داده و باعث تنظیم انتقال اکسیژن، دی‌اکسیدکربن و بخار آب می‌شود و تنفس، تبخیر و زوال میوه را به حداقل می‌رساند. کیتوزان همچنین دارای خاصیت ضدمیکروبی بوده که گستره وسیعی از میکروارگانیسم‌ها شامل قارچ‌ها، باکتری‌ها و ویروس‌ها را در بر می‌گیرد (Rabea *et al*., 2003). اردکانی و همکاران (Ardakani *et al*., 2009)، اثر کیتوزان بر افزایش زمان ماندگاری پس از برداشت و حفظ کیفیت انگور رقم شاهرودی را مورد بررسی قرار دادند، نتایج آن‌ها نشان داد که کیتوزان میزان کاهش وزن، ترک‌خوردگی، قهوه‌ای شدن، فساد و ریزش حبه‌ها را کاهش و کیفیت آن‌ها را به خوبی حفظ کرد. هرناندز مونوس و همکاران (۲۰۰۸) کاهش تنفس، تأخیر در پیری، کاهش وزن و کاهش پوسیدگی توت‌فرنگی را با کاربرد کیتوزان گزارش دادند. لی و جیانگ (Li and Jiang, 2000) نشان دادند که میوه‌های چشالو[2] تیمار شده با کیتوزان در مقایسه با شاهد آب کمتری از دست داده و تیمارهای کیتوزان باعث حفظ بهتر کیفیت میوه‌ها نسبت به تیمار شاهد شد.

هدف از انجام این پژوهش بکارگیری کیتوزان به‌عنوان یک ماده پوشش دهنده خوراکی و ارزیابی پتانسیل آن در افزایش زمان ماندگاری و حفظ کیفیت میوه انگور رقم فخری طی دوره نگهداری بود.

1- Edible Coating
2- *Dimocarpus longan*

مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی اثر غلظت‌های مختلف کیتوزان (صفر، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ درصد) و زمان انبارمانی (صفر، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ روز) بر کیفیت و عمر انبارمانی میوه انگور رقم فخری، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار (هر تکرار شامل یک خوشه) در آزمایشگاه گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان انجام شد.

تهیه نمونه‌های میوه انگور

میوه انگور رقم فخری از یک تاکستان تجاری واقع در ۴ کیلومتری جاده ملایر به اراک در منطقه افسریه شهرستان ملایر انتخاب شد. این تاکستان به عنوان یک باغ الگویی انگور که طی سال‌های مختلف به عنوان تاکستان نمونه از طرف وزارت جهاد کشاورزی انتخاب و معرفی شده، برای تهیه نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفت. این باغ دارای سیستم آبیاری قطره‌ای و نحوه تربیت کوردون[3] بوده و هر ساله هرس و تغذیه مناسب تاک‌ها صورت گرفته است. میوه انگور رقم فخری در اواخر شهریورماه، زمانی‌که میوه‌های انگور به مرحله بلوغ تجاری رسیده بودند، برداشت و با رعایت اصول صحیح جابه‌جایی، به آزمایشگاه گروه علوم و مهندسی باغبانی واقع در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان منتقل و پس از حذف حبه‌های آسیب‌دیده، خوشه‌ها با کلراکس ۰/۲۵ درصد به مدت پنج دقیقه ضدعفونی سطحی شدند.

تهیه محلول کیتوزان

برای تهیه محلول کیتوزان، از کیتوزان خریداری شده از شرکت سیگما الدریچ (کشور آمریکا) استفاده شد. پس از توزین مقدار مورد نیاز از این ماده، محلول کیتوزان ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ درصد در اسیداستیک ۱ درصد تهیه و پس از حل شدن کامل، pH آن با استفاده از سود ۰/۱ نرمال به ۵/۶ رسانده و سپس با اسیداستیک ۱ درصد به حجم نهایی رسانده شد و در نهایت به ازای هر لیتر محلول کیتوزان تهیه شده ۲ میلی‌لیتر توئین ۸۰ نیز اضافه شد (Ghasemi Tavalei *et al*., 2015). خوشه‌های ضدعفونی شده به مدت ۵ دقیقه در محلول کیتوزان با غلظت‌های صفر، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ درصد تیمار شدند. پس از اعمال تیمار و حذف رطوبت سطحی، خوشه‌ها در ظروف یکبار مصرف دربدار قرار داده شدند و به سردخانه با دمای ۴+ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۹۰-۸۵ درصد منتقل و نگهداری شدند.

3- Cordon Trellis System

اندازه‌گیری صفات کمی و کیفی میوه

تغییرات صفات کمی و کیفی در طی دوره انبارمانی مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌برداری و اندازه‌گیری صفات در ۴ مرحله انجام شد. مرحله اول پس از برداشت و قبل از قرار دادن نمونه‌ها در سردخانه و سه مرحله بعد هر کدام به فاصله زمانی ۲۰ روز یکبار، در طول دوره انبارمانی خوشه‌های انگور صورت گرفت. بدین منظور درصد آلودگی به روش و همکاران (Ozgur *et al.*, 2004)، درصد ریزش حبه به روش زو و همکاران (Xu *et al.*, 2007)، میزان قهوه‌ای شدن حبه به‌صورت نمره‌دهی (۱-کاملاً سبز ۲-کمی قهوه‌ای ۳-متوسط ۴-شدید ۵-خیلی شدید) به روش مستوفی و همکاران (Mostofi *et al.*, 2011)، اسیدآسکوربیک به روش باراکات و همکاران (Barakat *et al.*, 1973)، اسیدیته قابل تیتراسیون به روش میردهقان و رحیمی (Mirdehghan and Rahimi *et al.*, 2016) و فنل کل به روش سنگوتوان و همکاران (Senguttuvan *et al.*, 2014) انجام شد. میزان فعالیت آنزیم‌های فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز به روش تغییر یافته De Oliveira و همکاران (۲۰۱۶)، پلی‌فنل‌اکسیداز به روش تغییر یافته چن و همکاران (Chen *et al.*, 2010) و پراکسیداز به روش تغییر یافته منگ و همکاران (Meng *et al.*, 2008) اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری درصد کاهش وزن، میوه‌های هر تکرار در ابتدای آزمایش، قبل از ورود به انبار و پس از انتقال به انبار در فواصل زمانی تعیین شده با ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۱ گرم وزن شدند و درصد کاهش وزن بر اساس معادله زیر محاسبه گردید.

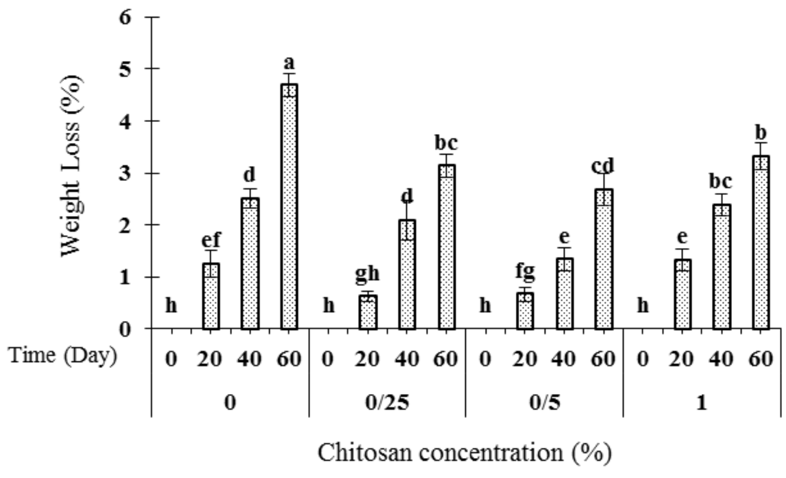
درصد کاهش وزن میوه $= W_1 - W_2 / W_1 \times 100$ (۱)

W_1: وزن اولیه W_2: وزن ثانویه

تجزیه واریانس داده‌ها به کمک نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین داده‌ها و اثر متقابل عوامل آزمایشی براساس آزمون LSD با سطح احتمال خطای ۵ درصد صورت گرفت.

نتایج و بحث

درصد کاهش وزن: بررسی نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد درصد کاهش وزن به مرور زمان افزایش یافت (شکل ۱) و در تمام دوره‌های انبارمانی درصد کاهش وزن در میوه‌های تیمار شده با کیتوزان ۰/۵ درصد کم‌تر از سایر تیمارها و شاهد بود و بین دو غلظت ۰/۵ و ۱ درصد کیتوزان تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. منگ و همکاران (Meng *et al.*, 2008) گزارش دادند که میوه‌های پوشش داده شده با کیتوزان در طول ذخیره‌سازی کاهش وزن کم‌تری در مقایسه با تیمار شاهد داشتند که می‌توان آن را به عدم انتشار گازها از طریق روزنه نسبت داد. زو و همکاران (Xu *et al.*, 2007)، گزارش کردند که کیتوزان با تشکیل غشای نیمه‌تراوا موجب تنظیم گازها، کاهش انتقال آب از بافت‌های میوه می‌شود.



شکل ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف کیتوزان و زمان انبارمانی بر درصد کاهش وزن

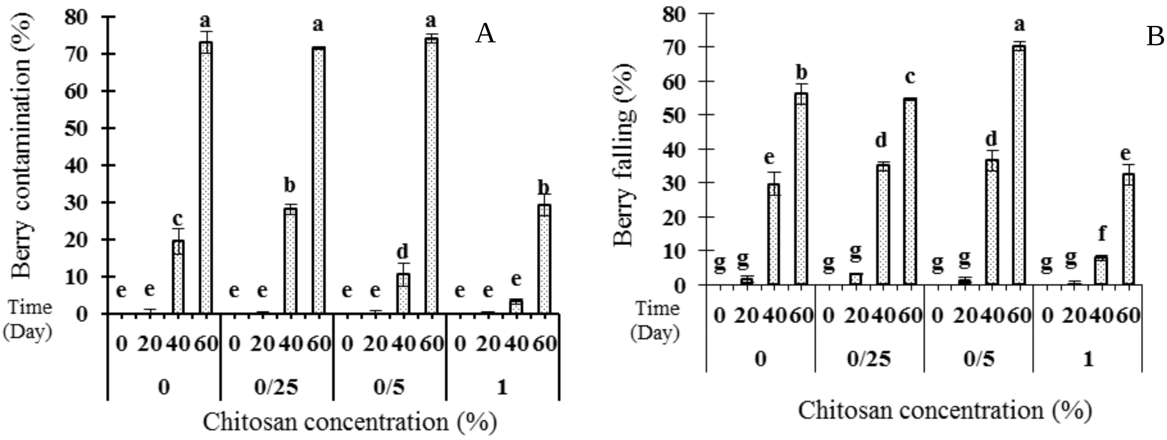
(حروف غیرمشابه و میله‌های روی هر ستون (Error Bars) به ترتیب بیانگر اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون LSD (P<0.05) و خطای استاندارد (Mean ±SE) می‌باشد).

Fig. 1- Effect of different concentrations of chitosan and storage time on the percentage of weight loss

(Dissimilar letters and bars on each column (Error Bars), respectively, indicate a significant difference based on the LSD test (P<0.05) and the standard error of the Mean (±SE)).

درصد آلودگی حبه: نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که میزان آلودگی حبه‌ها در طی دوره‌های انبارمانی افزایش و کیفیت میوه‌ها به‌تدریج کاهش یافت (شکل ۲–A). پس از ۶۰ روز انبارمانی کم‌ترین درصد آلودگی (۲۹/۱۶۶ درصد) در تیمار ۱ درصد کیتوزان مشاهده گردید که با اختلاف معنی‌داری نسبت به سایر غلظت‌ها و شاهد توانست میزان آلودگی را در طول دوره انبارمانی به‌خوبی کنترل کند و کیفیت میوه‌ها را برای مدت بیش‌تری در انبار حفظ کند. لیو و همکاران (Liu *et al*., 2007) بیان کردند که با افزایش غلظت کیتوزان رشد قارچ *بوتریتیس سینرا* و *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم* به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. در تحقیقات بسیاری خواص ضدمیکروبی کیتوزان به اثبات رسیده است. بررسی‌ها نشان داده‌اند که پوشش کیتوزان سرعت تجزیه ترکیبات فنلی (اولین خط دفاعی در جلوگیری از رشد قارچ) را کاهش داده و تولید β–۱،۳ گلوکاناز (دومین مکانیسم محدودکنندگی در برابر حمله سلول‌های قارچی و حفاظت از بافت در برابر مواد سمی) را تحریک می‌کند که بدین ترتیب موجب کاهش رشد قارچ‌ها می‌شود (Benhamou *et al*., 1994).

درصد ریزش حبه: نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت کیتوزان و زمان انبارمانی بر درصد ریزش حبه (شکل ۲–B) نشان داد که با گذشت زمان میزان ریزش حبه به‌طور معنی‌داری افزایش یافت و پس از ۶۰ روز انبارمانی کم‌ترین میزان ریزش حبه (۳۲/۲۶۷) مربوط به غلظت ۱ درصد کیتوزان بود که با سایر غلظت‌ها و شاهد تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد داشت. احتمالاً ریزش حبه در اثر کاهش رطوبت همراه با تولید اتیلن باشد که باعث تشکیل لایه سواگر شده و ریزش میوه را تحریک می‌کند (Sekoba., 2014). به نظر می‌رسد این تیمارها از تأثیر سطوح اتیلن و نیز ایجاد لایه سواگر در محل اتصال میوه‌ها به خوشه جلوگیری می‌نمایند. همچنین کاهش شدت تنفس و به دنبال آن کاهش هدر رفتن آب حبه‌ها منجر به کاهش شدت ریزش حبه در نمونه‌های پوشش داده شده گردیده است. افزایش ریزش حبه‌ها در میوه‌های فاقد پوشش احتمالاً می‌تواند ناشی از آلودگی قارچی و کاهش رطوبت در خوشه‌ها باشد.



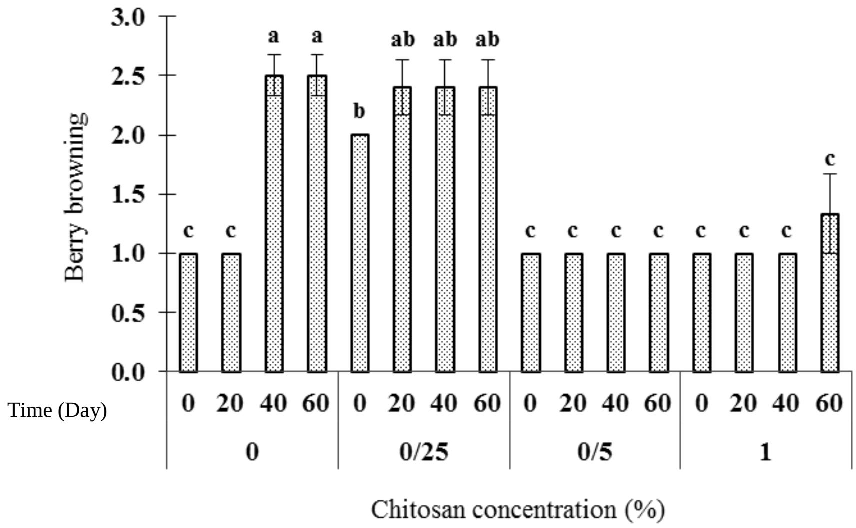
شکل ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف کیتوزان و زمان انبارمانی بر درصد آلودگی حبه (A) و درصد ریزش حبه (B)

(حروف غیرمشابه و میله‌های روی هر ستون (Error Bars) به ترتیب بیانگر اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون LSD (P<0.05) و خطای استاندارد (Mean ±SE) می‌باشد).

Fig. 2- Effect of different concentrations of chitosan and storage time on the percentage of berry contamination (A) and the percentage of berry falling (B)

(Dissimilar letters and bars on each column (Error Bars), respectively, indicate a significant difference based on the LSD test (P<0.05) and the standard error of the Mean (±SE)).

قهوه‌ای شدن حبه: بررسی نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت کیتوزان و زمان انبارمانی بر میزان قهوه‌ای شدن حبه (شکل ۳) نشان داد که کم‌ترین میزان قهوه‌ای شدن حبه (۱) مربوط به غلظت ۰/۵ و ۱ درصد کیتوزان بود که با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند. به‌طور کلی غلظت ۰/۵ و ۱ درصد کیتوزان توانستند به‌خوبی میزان قهوه‌ای شدن حبه را کنترل کنند. عامل مهم در تغییر بافت یا نرم شدن میوه، تجزیه پلی‌ساکاریدهای ساختمانی، به‌ویژه پکتین و همی‌سلولز است که در نتیجه این تجزیه دیواره سلولی ضعیف شده و اتصالات بین آن‌ها سست می‌شود و به دنبال آن اکسایش ترکیبات فنلی به‌وسیله آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز و تولید رنگ قهوه‌ای یا تیره اتفاق می‌افتد که نشانگر پیری بافت‌هاست (Meidani *et al*., 1997). لی و جیانگ (Li and Jiang *et al*., 2001) نشان دادند که تیمار کیتوزان قهوه‌ای شدن میوه‌ها را به تعویق انداخت.



شکل ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف کیتوزان و زمان انبارمانی بر میزان قهوه‌ای شدن حبه

(حروف غیرمشابه و میله‌های روی هر ستون (Error Bars) به ترتیب بیانگر اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون LSD (P<0.05) و خطای استاندارد (Mean ±SE) می‌باشد).

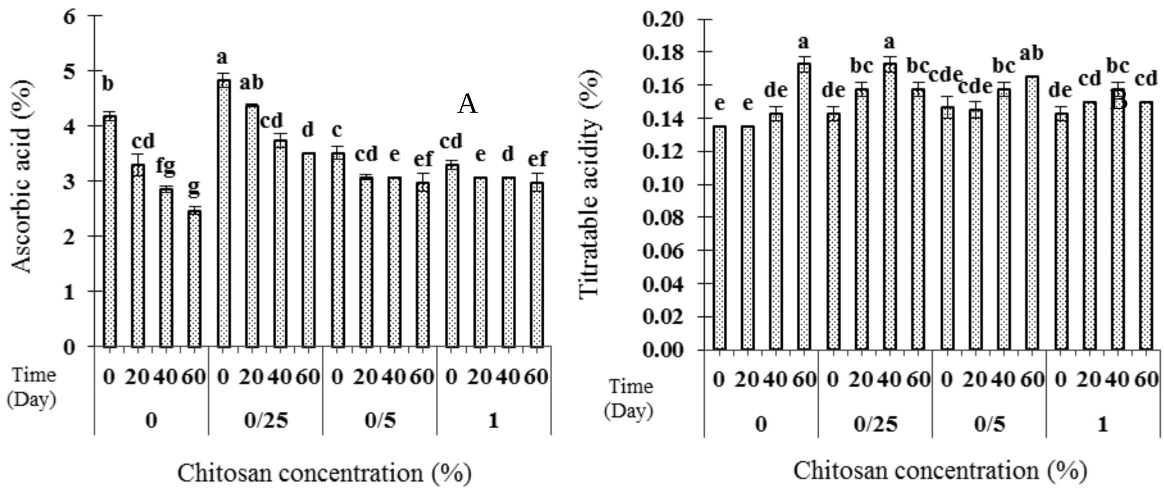
Fig. 3- Effect of different concentrations of chitosan and storage time on the browning of berries

(Dissimilar letters and bars on each column (Error Bars), respectively, indicate a significant difference based on the LSD test (P<0.05) and the standard error of the Mean (±SE)).

گزارش شده که کیتوزان تا حدودی از افزایش فعالیت پراکسیداز مرتبط با قهوه‌ای شدن در میوه‌های توت‌فرنگی تازه و تمشک‌های تیمار شده با کیتوزان جلوگیری می‌کند (Hajitaghilo *et al.*, 2017).

اسیدآسکوربیک: بررسی نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت کیتوزان و زمان انبارمانی بر میزان اسیدآسکوربیک (شکل ۴-A) نشان داد که میزان اسیدآسکوربیک باگذشت زمان انبارمانی کاهش یافت و پس از ۶۰ روز انبارمانی کم‌ترین میزان اسیدآسکوربیک (۲/۴۷۶ درصد) در شاهد مشاهده گردید. به‌طور کلی بین غلظت ۰/۵ و ۱ درصد کیتوزان تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. اسیدآسکوربیک ترکیبی ناپایدار است که به‌عنوان یک نوع اسید در میوه، با آغاز فرآیند پیری به‌سرعت در واکنش تنفسی مصرف می‌شود (Gil *et al.*, 2006). لی و جیانگ (Li and Jiang *et al.*, 2001) گزارش نمودند که سطوح بالاتر اسیدآسکوربیک در میوه‌های پوشش داده شده با کیتوزان ممکن است به‌دلیل کاهش اکسیژن و مهار تنفس باشد. کاهش اسیدآسکوربیک وابسته به حضور O_2 می‌باشد (O_2 سبب اکسیداسیون اسیدآسکوربیک می‌شود) وجود کیتوزان در فرمولاسیون پوشش میوه موجب کاهش انتشار O_2، در نتیجه پایین آمدن سرعت تنفس و تأخیر در رسیدن میوه و حفظ اسیدآسکوربیک می‌شود (Lerdthanangkul *et al.*, 1996).

اسیدیته قابل تیتراسیون (TA): نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت کیتوزان و زمان انبارمانی بر میزان اسیدیته قابل تیتراسیون (شکل ۴-B) نشان داد که اسیدیته قابل تیتراسیون به مرور زمان افزایش یافت اما در غلظت ۰/۵ و ۱ درصد این میزان افزایش جزئی بود و بیش‌ترین میزان اسیدیته قابل تیتراسیون (۰/۱۷۲ درصد) در ۶۰ روز پس از انبارمانی در شاهد و کم‌ترین میزان آن (۰/۱۵ درصد) در ۶۰ روز پس از انبارمانی در غلظت ۱ درصد کیتوزان مشاهده گردید. کیتوزان با ایجاد سد محافظتی در اطراف میوه از طریق ممانعت از ورود اکسیژن به داخل میوه میزان تنفس را کاهش می‌دهد (Jiang and Li., 2001). دوعا و همکاران (Djuoa *et al.*, 2010) گزارش کردند که درمیوه انبه اسیدیته قابل تیتراسیون تا ۹ روز پس از انبارمانی بدون تغییر باقی ماند ولی پس از آن اسیدیته قابل تیتراسیون در تیمار کیتوزان و شاهد افزایش یافت. قاسم نژاد و همکاران (Ghasemnezhad) *et al.*, 2010) نیز گزارش کردند که دلیل کاهش اسید آلی در پایان انبارمانی ممکن است به‌دلیل تغییرات متابولیک در میوه و یا ناشی از مصرف اسیدهای آلی در فرآیند تنفس باشد. کاهش اسیدیته قابل تیتراسیون ممکن است به‌دلیل گسترش آلودگی قارچی باشد که منجر به افزایش تنفس می‌شود.



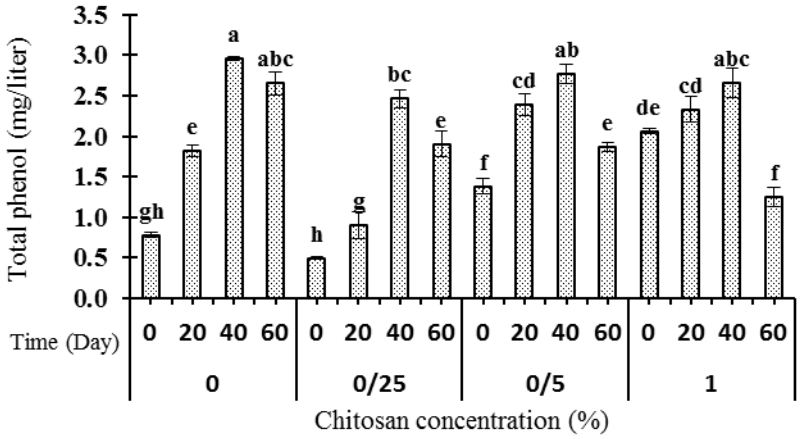
شکل ۴- تأثیر غلظت‌های مختلف کیتوزان و زمان انبارمانی بر اسیدآسکوربیک (A) و اسیدیته قابل تیتراسیون (B)

(حروف غیرمشابه و میله‌های روی هر ستون (Error Bars) به ترتیب بیانگر اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون LSD (P<0.05) و خطای استاندارد (Mean ±SE) می‌باشد).

Fig. 4- Effect of different concentrations of chitosan and storage time on ascorbic acid (A) and titratable acidity (B)

(Dissimilar letters and bars on each column (Error Bars), respectively, indicate a significant difference based on the LSD test (P<0.05) and the standard error of the Mean (±SE)).

فنل کل: بررسی نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت کیتوزان و زمان انبارمانی بر میزان فنل کل (شکل ۵) نشان داد که میزان فنل تا ۴۰ روز پس از انبارمانی روند افزیشی داشت و پس از آن در پایان دوره انبارمانی کاهش یافت. بیش‌ترین میزان فنل (۲/۹۶۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در ۴۰ روز پس از انبارمانی در شاهد مشاهده گردید. افزایش در میزان فنل میوه انگور می‌تواند به‌دلیل از دست رفتن کلروفیل و شروع سنتز ترکیبات فنلی باشد که مصادف با دوره تغییر رنگ حبه‌ها است (Rabea *et al.*, 2003). سالزو و همکاران (Scalzo *et al.*, 2004) کاهش میزان فنل در طول مدت انبارمانی را به فرآیند پیری نسبت دادند.



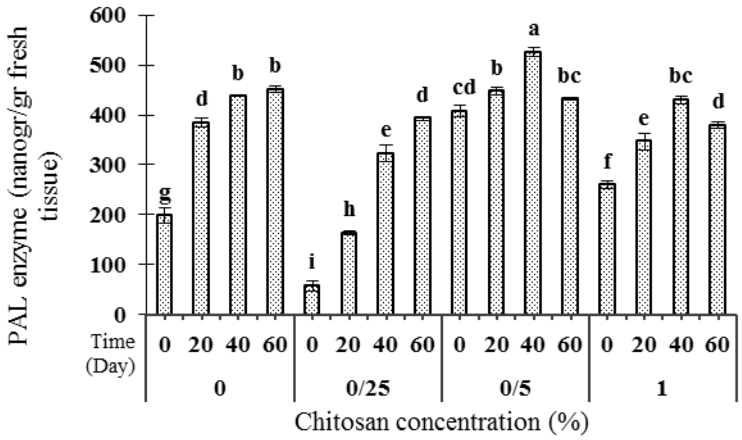
شکل ۵- تأثیر غلظت‌های مختلف کیتوزان و زمان انبارمانی بر میزان فنل کل

(حروف غیرمشابه و میله‌های روی هر ستون (Error Bars) به ترتیب بیانگر اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون LSD (P<0.05) و خطای استاندارد (Mean ±SE) می‌باشد).

Fig. 5- Effect of different concentrations of chitosan and storage time on the amount of total phenol

(Dissimilar letters and bars on each column (Error Bars), respectively, indicate a significant difference based on the LSD test (P<0.05) and the standard error of the Mean (±SE)).

آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (PAL): نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت کیتوزان و زمان انبارمانی بر میزان فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (شکل ۶) نشان داد که میزان فعالیت این آنزیم در طی دوره انبارمانی افزایش یافت و بیش‌ترین میزان فعالیت آن (۵۲۶/۵ نانوگرم بر گرم بافت تر) ۴۰ روز پس از انبارمانی در غلظت ۰/۵ درصد کیتوزان مشاهده گردید. ناس و همکاران (Nath *et al.*, 2015) بیان کردند پاتوژن و آلودگی در میوه موز باعث افزایش فعالیت این آنزیم گردید. افزایش در فعالیت این آنزیم موجب قهوه‌ای شدن و پوسیدگی بافت میوه‌ها و سبزی‌های تازه در طی دوره انبارمانی می‌گردد (Fujita *et al.*, 2006). این آنزیم با استرس‌های مختلف زنده (آلودگی با ویروس‌ها، باکتری‌ها قارچ‌ها و غیره) و غیرزنده (دمای بالا و پایین، اشعه فرابنفش، زخم شدن و غیره) تحریک می‌شود که نتیجه آن تجمع فنیل پروپانوئیدهایی مانند اسیدهای فنولیک و فلاونوئیدها است (Eraslan *et al.*, 2007).



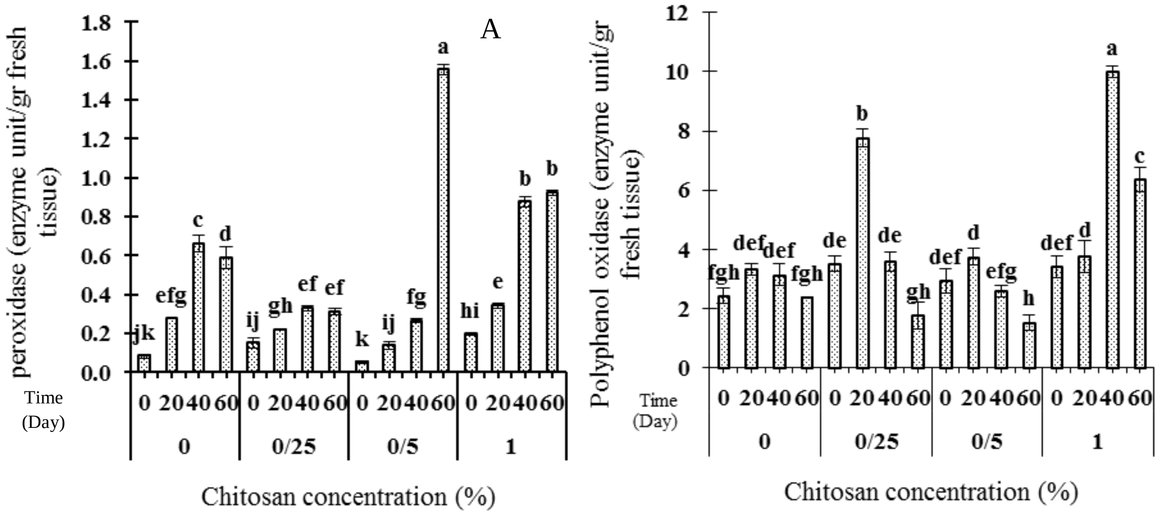
شکل ۶- تأثیر غلظت‌های مختلف کیتوزان و زمان انبارمانی بر میزان فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (حروف غیرمشابه و میله‌های روی هر ستون (Error Bars) به ترتیب بیانگر اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون LSD (P<0.05) و خطای استاندارد (Mean ±SE) می‌باشد).

Fig. 6- Effect of different concentrations of chitosan and storage time on the activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) enzyme (dissimilar letters and bars on each column (Error Bars), respectively, indicate a significant difference based on the LSD test (P<0.05) and the standard error of the Mean (±SE)).

آنزیم پراکسیداز (POD): بر اساس نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت کیتوزان و زمان انبارمانی بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (شکل ۷-A)، میزان فعالیت این آنزیم در طی دوره انبارمانی روند افزایشی داشت به‌شکلی که بیش‌ترین میزان فعالیت آن (۱/۵۵۵ واحد آنزیم بر گرم بافت تر) در ۶۰ روز پس از انبارمانی در غلظت ۰/۵ درصد کیتوزان مشاهده گردید. سکوبا (Sekoba, 2014) در بررسی اثر کیتوزان و نانو سیلیکا بر افزایش عمر انباری انگور گزارش کرد که فعالیت آنزیم پراکسیداز تا پایان دوره انباری روند صعودی داشت. یکی از تغییراتی که در زمان تنش‌های زنده و غیرزنده به‌وجود می‌آید تولید گونه‌های اکسیژن فعال است. آنزیم پراکسیداز از آنزیم‌های سیستم دفاعی گیاه می‌باشد. وظیفه این آنزیم سم‌زدایی و تجزیه پراکسیداز هیدروژن تولید شده در سلول‌ها است (Adriano *et al.*, 2005). در طول انبارمانی میوه، فعالیت بالای پراکسیداز می‌تواند منجر به کاهش واکنش قهوه‌ای شدن و در نتیجه سبب افزایش عمر انباری گردد (Mirdehghan *et al.*, 2016). افزایش گونه‌های فعال اکسیژن و رادیکال‌های آزاد در طی فرآیند رسیدن می‌تواند موجب ایجاد خسارت به غشاهای سلولی و افزایش سرعت پیری محصول گردد. سیستم آنتی‌اکسیدانی با خنثی کردن رادیکال‌های آزاد باعث جلوگیری از اثر سوء آن‌ها می‌شود. تیمارهایی که باعث کاهش تنفس و تولید اتیلن و در نتیجه باعث کاهش سرعت پیری می‌شوند باعث کاهش سرعت تولید رادیکال‌های آزاد و در نتیجه کاهش مصرف آنتی‌اکسیدان‌ها می‌شوند (Meng *et al.*, 2008).

آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز (PPO): بررسی نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت کیتوزان و زمان انبارمانی بر میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز (شکل ۷-B) نشان داد که فعالیت این آنزیم در طی دوره انبارمانی ابتدا افزایش و سپس کاهش یافت و بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز (۶/۳۵۲ واحد آنزیم بر گرم بافت تر) در غلظت ۱ درصد کیتوزان در ۴۰ روز پس از انبارمانی مشاهده گردید. قهوه‌ای شدن آنزیمی یکی از مشکلات میوه‌ها بعد از برداشت می‌باشد. قهوه‌ای شدن حبه‌ها در انگور با اکسیداسیون طبیعی مواد

فنلی توسط آنزیم پلی فنل‌اکسیداز در ارتباط بوده و این آنزیم مهم‌ترین علت قهوه‌ای شدن می‌باشد (Hajitaghilo *et al.*, 2017). آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز غالباً در طی رسیدگی و پیری و یا در شرایط تنش زمانی که به غشاء آسیب وارد می‌شود، فعال می‌شود (Mayer., 1987). نتایج به‌دست آمده نشان داد که میوه‌های پوشش داده شده با کیتوزان از فعالیت آنزیمی بیش‌تری نسبت به میوه‌های بدون پوشش طی دوره انبار برخوردار بودند که با نتایج برزمان و همکاران (Barzaman *et al.*, 2018) که در بررسی کاربرد توأم پلی‌آمین‌ها و کیتوزان بر ترکیبات زیستی فعال و قهوه‌ای شدن میوه پسته تر گزارش کردند، میوه‌های پوشش داده شده با کیتوزان از فعالیت آنزیمی بیش‌تری برخوردار بودند، مطابقت داشت.



شکل ۷- تأثیر غلظت‌های مختلف کیتوزان و زمان انبارمانی بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (A) و پلی‌فنل‌اکسیداز (B)

(حروف غیرمشابه و میله‌های روی هر ستون (Error Bars) به ترتیب بیانگر اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون LSD ($P<0.05$) و خطای استاندارد (Mean ±SE) می‌باشد).

Figure 7- Effect of different concentrations of chitosan and storage time on the activity of peroxidase (A) and polyphenol oxidase (B)

(Dissimilar letters and bars on each column (Error Bars), respectively, indicate a significant difference based on the LSD test ($P<0.05$) and the standard error of the Mean (±SE)).

نتیجه‌گیری

به‌نظر می‌رسد پوشش خوراکی کیتوزان می‌تواند باعث حفظ کیفیت میوه‌ها به مدت طولانی‌تر و در نتیجه افزایش عمر انبارمانی انگور شود. نتایج نشان داد که غلظت ۱ درصد کیتوزان به‌خوبی توانست آلودگی، ریزش حبه، کاهش اسیدیته قابل تیتراسیون و کاهش اسیدآسکوربیک را کنترل نماید و بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در غلظت ۱ درصد کیتوزان مشاهده گردید و غلظت ۰/۵ درصد کیتوزان نیز سبب جلوگیری از کاهش وزن و قهوه‌ای شدن حبه‌ها نسبت به سایر غلظت‌ها و نمونه شاهد گردید و بیش‌ترین میزان فنل کل و بالاترین میزان فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز و پراکسیداز نیز مربوط به غلظت ۰/۵ درصد کیتوزان بود، این در حالی بود که بین دو غلظت ۰/۵ و ۱ درصد کیتوزان در بیش‌تر صفات تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد. هرچند بین دو غلظت ۱ و ۰/۵ درصد کیتوزان در برخی موارد تفاوت معنی‌داری دیده نشد، اما به‌طور کلی غلظت ۱ درصد بهتر از ۰/۵ درصد کیتوزان توانست سبب افزایش عمر انبارمانی و حفظ کیفیت میوه انگور شود.

سپاسگزاری

مقاله حاضر مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد می باشد، لذا نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به دلیل حمایت‌های مادی و معنوی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

1. Ardakani, M.D., Mostofi, Y. & Hedayatnejad, R. (2009). Study on the effects of chitosan in preserving some qualitative factors of table grape (*Vitis vinifera* 'Shahroudi'). *VI International Postharvest Symposium* 877: 739-742. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.877.97.

2. Adriano, S., Bartolomeo, D., Cristos, X., & Andras, M. (2005). Antioxidant defenses in Olive trees during drought stress: changes in activiting of some antioxidant enzymes. *Functional Plant Biology* 32: 45-53. https://doi.org/10.1071/FP04003.
3. Barakat, M.Z., Shahab, S.K., Darwish, N., & El-Zoheiry, A. (1973). A new titrimetric method for the determination of vitamin C. *Analaytical Biochemistry* 53: 245-251.
4. Barzaman, M., Mirdehgan, S.H., & Nazoori, F. (2018). Combined application of polyamines and chitosan on bioactive compound and browning of fresh pistachio. *Nutrition Science and Food Technology 15*(81): 357-374. (In Persian)
5. Benhamou, N., Lafontaine, P.J., & Nicole, M. (1994). Induction of systemic resistance to fusarium crown and root rot in tomato plants by seed treatment with chitosan. *Phytopathology* 84: 1432-1444.
6. Chen, S., Zhang, M., & Wang, S. (2010). Physiological and quality responses of Chinese 'Suli'pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd) to 1-MCP vacuum infiltration treatment. *Journal of the Science of Food and Agriculture 90*(8): 1317-1322. https://doi.org/10.1002/jsfa.3939.
7. De Oliveira, I.R., Crizel, G.R., Severo, J., Renard, C.M., Chaves, F.C., & Rombaldi, C.V. (2016). Preharvest UV-C radiation influences physiological, biochemical and transcriptional changes in strawberry cv. Camarosa. *Plant Physiology and Biochemistry* 108: 391-399. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.08.012.
8. Djuoa, T., Charles, F., Freire, J.M., Filgueiras, H., Marie-Noello, D., & Sallanon, H. (2010). Combined effects of postharvest heat treatment and chitosan coating on quality of fresh-cut mangoes (*Mangifera Indica* L.). *International Journal of Food Science and Technology* 45: 849-855. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02209.x.
9. Dutta, P., Tripathi, S., Mehrotra, G., & Dutta, J. (2009). Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry 114*(4): 1173-1182. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.047.
10. Eraslan, F., Inal, A., Gunes, A., & Alpaslan, M. (2007). Impaect of exogenouse salicylice acid on the growth antioxidant activity and physiology of carrot plants subjected to combined salinity and boron toxicity. *Scientia Horticulturae* 113:120-128. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.03.012.
11. Fujita, N., Tanaka, E., & Murata, M. (2006). Cinnamaldehyde inhibits phenylalaninc ammonia-lyase and enzymatic browning of cut lettuce. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 70*(3): 672-676. https://doi.org/10.1271/bbb.70.672.
12. Ghasemi Tavalei, M., Ramin, A.A., & Amini, F. (2015). The effect of chitosan edible coating on quality and extension of postharvest life of cucumber in Zomorod. *Production and Processing of Crops and Horticulture 5*(15): 197-189.
13. Ghasemnezhad, M., Shiri, M.A., & Sanavi, M. (2010). Effect of chitosan coatings on some quality indices of apricot (*Prunus armeniaca* L.) during cold storage. *Environmental Science* 8: 25-33.
14. Gil, M.I., Aguayo, E., & Kader, A.A. (2006). Quality changes and nutrient retention in fresh-cut versus whole fruits during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry 54*(1): 96-4284. https://doi.org/10.1021/jf060303y.
15. Hajitaghilo, R., Jalili Marandi, R., Asghari, M.R., & Hemmaty, S. (2017). Effects of postharvest treatment with chitosan and salicylic acid on fungal decay caused by *Botrytis cinerea* and quality of rishbaba table grape (*Vitis vinifera* L.). *Research in Pomology 2*(1): 15-30. (In Persian)
16. Hernandez-Munos, P., Almenar, E., Del Valle, V., Velez, D., & Gavaara, R. (2008). Effect of chirosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*Fragaria ananassa*) quality during refrigerated storage. *Food Chemistry* 110: 428-435. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.020.
17. Jiang, Y., & Li, Y. (2001). Effects of chitosan on postharvest life and quality of longan fruit, *Food Chemistry* 73: 139-143. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00246-6.
18. Lerdthanangkul, S., & Krootha, J.M. (1996). Edible coating effects on postharvest quality of green bell peppers. *Journal of Food Science* 61: 176-179. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1996.tb14753.x.
19. Liu, H.F., Wu, B.H., Fan, P.G., Xu, H.Y., & Li, S.H. (2007). Inheritance of sugars and acids in berries of grape. *Euphytica* 153: 99-107.
20. Mayer, A.M. (1987). Polyphenol oxidase and peroxidase in plants recent progress. *Phytochemistry* 26: 11- 20.
21. Meidani, J., & Hashemi Dezfouli, A.A. (1997). *Postharvest physiology*. Publication of Agriculture Education in Karaj, P. 403.
22. Meng, X., Li, B., Liu, J., & Tian, S. (2008). Physiological responses and quality attributes of table grape fruit to chitosan preharvest spray and postharvest coating during storage. *Food Chemistry 106*(2): 501-508. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.012.
23. Mirdehghan, S.H., & Rahimi, S. (2016). Pre-harvest application of polyamines enhances antioxidants and table grape (*Vitis vinifera* L.) quality during postharvest period. *Food Chemistry* 196: 1040-1047. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.038.

24. Mostofi, Y., Dehestani Ardakani, M., & Razavi, S.H. (2011). The effect of chitosan on postharvest life extension and qualitative characteristics of table grape “Shahroodi”. *Journal of Food Science and Technology 8*(31): 93-104.
25. Nath, K., Solanky, K.U., Mahatma, M.K., Madhubala, S.R., & Rakesh, M. (2015). Role of total soluble sugar, phenols and defense related enzymes in relation to Banana fruit rot by *Lasiodiplodia Theobromae* [(Path.) Griff. and Maubl.] during ripening. *Journal* of *Plant Pathology* and *Microbiology 6*(299): 2-8.
26. Nejatian, M.A., & Doulati Baneh, H. (2016). Identification, distinctness and registration of commercial and native grape cultivars of Iran. *Iranian Journal of Horticultural Science 47*(3): 581-594.
27. Ozgur, A., Gabler, K., Mansour, M., & Smilanick, J.L. (2004). Postharvest ethanol and hot water treatments of table grapes to control gray mold. *Postharvest Biology and Technology 34*(2): 169-177. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2004.05.003.
28. Rabea, E.I., Badawy, M.E.T., Stevens, C.V., Smagghe, G., & Steurbaut, W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules 4*(6): 1457-1465. https://doi.org/10.1021/bm034130m.
29. Scalzo, R.L., Iannoccari, T., Summa, C., Morelli, R., & Rapisarda, P. (2004). Effect of thermal treatments on antioxidant and antiradical activity of blood orange juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry 85*(1): 41-47. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.05.005.
30. Sekoba, E. (2014). *Influence of postharvest chitosan and nano silica coating application on preservation of fruit quality and shelf life of grape cv. Bedaneh -Sefid*. Master's degree in horticulture. University Zanjan, P. 36.
31. Senguttuvan, J., Paulsamy, S., & Karthika, K. (2014). Phytochemical analysis and evaluation of leaf and root parts of the medicinal herb, *Hypochaeris radicata* L. for in vitro antioxidant activities. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 4: 359-367. https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C1030.
32. Xing, Y., Xu, Q., Li, X., Chen, C., Ma, L., Li, S., & Lin, H. (2016). Chitosan-based coating with antimicrobial agents: preparation, property, mechanism, and application effectiveness on fruits and vegetables. *International Journal of Polymer Science* 1-24. https://doi.org/10.1155/2016/4851730.
33. Xu, W.T., Huang, K.L., Guo, F., Qu, W., Yang, J.J., Liang, Z.H., & Luo, Y.B. (2007). Postharvest grapefruit seed extract and chitosan treatments of table grapes to control *Botrytis cinerea*. *Postharvest Biology and Technology 46*(1): 86-94. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.03.019.